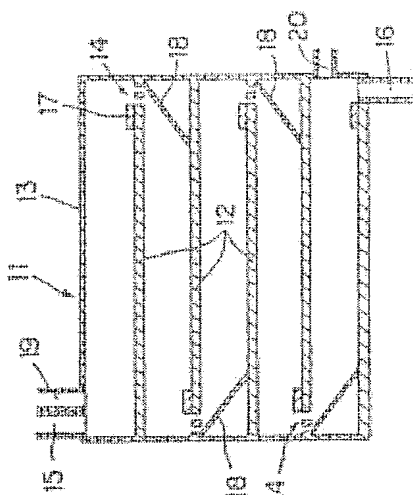


# APPARATUS FOR CELL CULTURE

**Publication number:** JP63233779 (A)  
**Publication date:** 1988-09-29  
**Inventor(s):** HIRAI YOHEI; ASAKO SHIGERU; NISHIMURA AKIRA +  
**Applicant(s):** SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES +  
**Classification:**  
- international: C12M3/04; C12M3/04; (IPC1-7): C12M3/04  
- European:  
**Application number:** JP19870069360 19870324  
**Priority number(s):** JP19870069360 19870324

## Abstract of JP 63233779 (A)

**PURPOSE:** To obtain a cell culture apparatus capable of running cell culture for a long period of time by arranging a plurality of cell-adhering plates surrounded with a supporting frame so as to flow the culture mixture in the prescribed direction and feed the fresh culture medium continually to the cells.  
**CONSTITUTION:** A plurality of cell-adhering plates 12, preferably made hydrophilic at least partially, as a culture bed to which cells adhere to proliferate, are arranged so that the culture medium flows in the prescribed direction. The cell-adhering plates 12 are surrounded with the supporting frame 13 and the inlet 15 for introduction of the cell suspension and the culture medium and the outlet 16 are opened in the upper and lower parts of the frame respectively. A hole 14 for flowing down the culture medium to the next plate down 12 is formed on one end of each plate 12 and, when desired, a depression or projection 17 is formed at an proper point to store the medium tentatively.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-233779

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>  
C 12 M 3/04

識別記号 庁内整理番号  
A-8717-4B

④ 公開 昭和63年(1988)9月29日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 細胞培養装置

② 特 願 昭62-69360

② 出 願 昭62(1987)3月24日

⑦ 発 明 者 平 井 洋 平 大阪府大阪市此花区島屋1丁目1番3号 住友電気工業株式会社大阪製作所内  
⑦ 発 明 者 浅 古 茂 大阪府大阪市此花区島屋1丁目1番3号 住友電気工業株式会社大阪製作所内  
⑦ 発 明 者 西 村 昭 大阪府大阪市此花区島屋1丁目1番3号 住友電気工業株式会社大阪製作所内  
① 出 願 人 住友電気工業株式会社 大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地  
④ 代 理 人 弁理士 亀井 弘勝 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞培養装置

2. 特許請求の範囲

1. 細胞が接着する細胞付着板と、該細胞付着板を囲繞する支持枠とを有する細胞培養装置であって、前記細胞付着板が、培養液が所定方向に流れるように複数段配列されていることを特徴とする細胞培養装置。
2. 細胞付着板に孔が設けられると共に、複数段からなる細胞付着板が最上段の細胞付着板側から供給された培養液を順次下段の細胞付着板に供給できるように配列されている上記特許請求の範囲第1項記載の細胞培養装置。
3. 細胞付着板が、凸部または凹部を有するものである上記特許請求の範囲第1項または第2項記載の細胞培養装置。
4. 細胞付着板の表面が、少なくとも部分

的に親水化処理されている上記特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の細胞培養装置。

4. 細胞付着板の表面のうち少なくとも一部に、生体由来の細胞接着物質が塗布されている上記特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の細胞培養装置。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は細胞を育成させるための細胞培養装置に関する。より詳しくは、細胞付着板を用いて接着性細胞を大量培養するのに好適な細胞培養装置に関する。

<従来の技術>

近年、生物の細胞を培養し、その細胞の代謝活動により有用な生理活性物質、例えば、ワクチン、ホルモン、インターフェロン、モノクローナル抗体等を生産する研究が活発に行なわれている。

このような方法において、従来、動物細胞の培

養は、一般に、ガラスシャーレやルー瓶等を用いて培養されていたが、大量に培養する際には、同時に多数のシャーレもしくはルー瓶を用意しなければならず、取扱いが非常に煩雑である。

かかる問題点から、上記の有用物質を工業的に生産するには、細胞のin vitroでの大量培養技術の確立が不可欠であり、近年、細胞の接着面積を増加させ、コンパクトな装置を用いて大量の細胞培養を行なう試みがなされている。例えば、細胞培養容器を二重にしたもの（特開昭58-92782号公報）や、細胞培養用プレートを重ね合せたもの（特開昭58-78583号公報）が提案されている。

#### < 発明が解決しようとする問題点 >

しかしながら、上記の細胞培養装置によると、装置当りの細胞の接着面積を広くすることは可能であるが、培養液の交換が無いため接着した細胞に栄養分、酸素等が十分に供給されず、長期に亘り細胞培養を行なうことが困難であるという問題があった。

#### < 目的 >

向に流れるように配列されているので、細胞付着板に接着した細胞に新鮮な培養液を常に供給することができると共に、細胞が産生する有用物質を円滑に回収することができる。また、上記細胞付着板が複数段に配列されているので、細胞が接着する接着表面積を大きくすることができる。

#### < 実施例 >

以下に、本発明の細胞培養装置の実施例を添付図面に基づいて説明する。

第1図は細胞培養装置の一実施例を示す概略図であり、この例では、最も基本的な構造の細胞培養装置を示している。細胞培養装置(1)は、細胞が接着して増殖する培養床としての2枚の細胞付着板(2)と、該細胞付着板(2)を圍繞する支持棒(3)とを有しており、上記細胞付着板(2)は、細胞の接着面積を大きくするため、2段に互いに平行に配列されている。すなわち、上記細胞付着板(2)のうち上方の細胞付着板(2)は、支持棒(3)の側部内面に固着されていると共に、細胞付着板(2)の一方の端部には、培養液等を下方の細胞付着板(2)に流下させ

この発明は上記問題点に鑑みてなされたものであり、装置当りの細胞の接着面積を大きくし、かつ新鮮な培養液を細胞表面に常に供給して細胞培養を長期に亘り行なうことができると共に有用物質の回収および老廃物の排出を効率的に行なうことができる細胞培養装置を提供することを目的とする。

#### < 問題点を解決するための手段および作用 >

上記目的を達成すべくなされた本発明の細胞培養装置は、細胞が接着する細胞付着板と、該細胞付着板を圍繞する支持棒とを有する細胞培養装置であって、前記細胞付着板が、培養液が所定方向に流れるように複数段配列されていることを特徴とするものである。特に、細胞付着板に孔が設けられると共に最上段側から供給された細胞液が順次下段の細胞付着板に流れ、すべての細胞付着板表面と接触するように細胞付着板を配列するのが好ましい。

上記の構成よりなる細胞培養装置によれば、支持棒で圍繞された細胞付着板が、培養液が所定方

るため、孔(4)が形成されている。また、下方の細胞付着板(2)は、上記支持棒(3)の底部に配設されている。

また、上記支持棒(3)の上部適所には、培養する細胞が懸濁された細胞懸濁液および培養液を注入する注入口(5)が装着され、支持棒(3)の下部には、上記細胞懸濁液および培養液を流出させる流出口(6)が装着されている。

上記構造の細胞培養装置によれば、前記注入口(5)から細胞懸濁液を注入して細胞を前記細胞付着板(2)に接着させた後、細胞懸濁液を前記流出口(6)から流出させると共に、注入口(5)から培養液を注入すると、培養液は、上段の細胞付着板(2)および孔(4)を経て下段の細胞付着板(2)に順次流下し、一定の方向に流れ、前記流出口(6)から流出する。従って、前記細胞付着板(2)に接着した細胞に新鮮な培養液を常に供給することができる。また、増殖細胞が産生する生理活性物質等の有用物質を前記培養液とともに回収し、精製することができると共に、細胞が副生する老廃物を回収することがで

きる。

上記細胞付着板(2)としては、細胞が接着し、伸展、増殖しうるものであればいかなるものも使用できるが、材料に毒性がなく耐久性の大きなものが好ましい。上記細胞付着板(2)の材料としては、例えば、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル等のアクリル系ポリマー、ポリテトラフルオロエチレン、ポリヘキサフルオロプロピレン、テトラフルオロエチレン-ヘキサフルオロプロピレン共重合体等のフッ素系ポリマー等が例示される。

上記材料からなる細胞付着板(2)は、そのままの状態で行用することもできるが、疎水性材料にあっては、細胞が接着し易くすると共に伸展、増殖性を高めるため、細胞付着板(2)の表面が、少なくとも部分的に親水化処理されているものが好ましい。また、細胞付着板(2)の表面のうち少なくとも一部に、生体由来の細胞接着物質が塗布されているものが好ましい。

的に貯溜させる。また、細胞付着板(12)の突出端部と、下段の細胞付着板(12)の間には、培養液等を下段の細胞付着板(12)にスムーズに案内するため、斜方向に案内板(18)が設けられている。

また、上記支持棒(13)の上部には、注入口(15)と隣設して酸素ガス等を注入するガス注入口(19)が装着され、支持棒(13)の側面下部にはガス注入口(19)から注入されたガスを流出させるためのガス流出口(20)が装着されている。

上記構造の細胞培養装置によれば、新鮮な培養液とガスとを細胞に供給できると共に、培養液が細胞付着板(12)上で貯溜される。しかも下段の細胞付着板(12)に円滑に供給されることと、多数の細胞付着板(12)により細胞の接着表面積が大きいこととが相まって、装置当りの細胞の接着表面積を大きくし、かつ新鮮な栄養分等を細胞に供給しつつ大量に細胞培養を行なうことができ、また流出口(16)より増殖細胞が排出する有用物質を回収、精製、および細胞が副生する老廃物を回収することができる。

なお、上記構造の細胞培養装置では、2枚の細胞付着板(2)を配列しているが、装置当りの細胞の接着表面積を大きくするため、上記細胞付着板(2)を多数用い、多段に配列するのが好ましい。また、細胞付着板(2)は、互いに水平に配列されている必要はなく、互いに傾斜角度、傾斜方向が異なってもよい。さらには、細胞付着板は、平面状である必要はなく、細胞付着板に接着した細胞に栄養分等を供給する培養液が一時的に貯溜できるように、細胞付着板の適所に凸部または凹部が形成されていてもよい。また、前記流出口(6)には、培養液等の流出量を調整するため、調整弁が設けられていてもよい。

第2図は細胞培養装置の他の態様を示す断面図である。この細胞培養装置(11)では、支持棒(13)内に細胞付着板(12)が多段に配列されていると共に各細胞付着板(12)の突出端部には、凸部(17)が形成されており、培養液等が細胞付着板(12)の端部に形成された孔(14)を経て下段の細胞付着板(12)に直ちに流下するのを抑制して培養液等を一時

なお、上記構造の細胞培養装置において、酸素ガス等は、ガス流出口、すなわち、下方から注入し、ガス注入口から流出させてもよい。また、前記細胞付着板の凸部は、突条、凹部または凹溝等として形成されていてもよい。

第3図は細胞培養装置のさらに他の態様を示す断面図であり、この細胞培養装置(21)では、波形に湾曲した形状を有する細胞付着板(22)を支持棒(23)内に非平行な状態で多段に配列している。また、上記各細胞付着板(22)は、上記の例と同様に、一端が支持棒(23)に固着されており、他端部、すなわち突出端部には、孔(24)が形成されている。また、各細胞付着板(22)の突出端部と下方の細胞付着板(22)の間には、培養液等を円滑に流出下させるための案内板(28)が配設されている。さらには、支持棒(23)には、細胞懸濁液、培養液を注入、流出させる注入口(25)、流出口(26)がそれぞれ装着されていると共に、酸素ガス等を注入、流出させるガス注入口(29)、ガス流出口(30)が装着されている。

上記構造の細胞培養装置によれば、細胞付着板(22)が波型の湾曲状であるため、細胞の接着表面積が大きくなると共に、上記注入口(25)から注入された培養液等が細胞付着板(22)の湾曲凹部に一時的に貯溜され、細胞が円滑に伸展、増殖する場が提供されると共に、湾曲部により培養液を乱流状態で均一に供給することができる。また、上記形状の細胞付着板(22)を多段に配列しているので、培養液は、一定の方向に流れると共に、細胞付着板(22)に接着した細胞に新鮮な培養液等が供給され、細胞が産生する有用物質等を回収したり、精製することができる。

なお、上記の例では、細胞付着板として、湾曲形状のものを使用しているが、他の形態で表面に凹凸部を有する細胞付着板であってもよい。また、上記波型に湾曲した細胞付着板あるいは平板状の細胞付着板を支持枠内に螺旋状に配設してもよく、この場合、支持枠の中央部に立設された支柱に沿って、上記細胞付着板を螺旋状に配設してもよい。このような螺旋状に配設された細胞付着板によれば、細胞付着板間のピッチを小さくすることにより、細胞の接着表面積を大きくすることができるだけでなく、前記孔、案内板を設けずとも培養液等が円滑に流れ、細胞に新鮮な栄養分等が供給されると共に、細胞が産生する有用物質等を円滑に回収することができる。

本発明の細胞培養装置は、種々の細胞の培養に使用することができ、細胞の種類は特に限定されず生体由来細胞、株化細胞等が挙げられ、例えば、チャイニーズハムスター肺由来細胞V-79、ヒト子宮癌由来細胞HeLa、ヒト胎児肺由来細胞MRC-5、ヒト肝由来細胞Chang Liver、ヒト肺由来正二倍体線維芽細胞IRC-90、ヒトリンパ腫由来ナマルバ細胞等が例示される。

また、本発明の細胞培養装置を用いて動物細胞を培養する場合、培養する細胞の種類に応じて種々の培養液が用いられ、細胞の増殖に適した至適温度、pH等の条件で培養が行なわれ、回収した培養液より有用物質は分離精製される。

#### <実験例>

以下に、実験例に基づき、本発明をより詳細に説明する。

##### 実験例1

細胞付着板として突出端部に凸部が形成されたポリスチレン板を5枚用い、第2図に示されるような5段の培養床を有する細胞培養装置を作製した。なお、培養床としての細胞付着板の細胞付着可能な面積は、合計2500cm<sup>2</sup>であった。培養液として、Eagle MEM培地に5%牛胎児血清を添加したものを用い、細胞懸濁液として、上記培養液にウサギ腎由来株化RK<sub>13</sub>細胞を懸濁させたもの(細胞数4.2×10<sup>4</sup>個/ml)を用いた。上記細胞培養装置を37℃に保たれた恒温槽内に設置し、上記細胞懸濁液730mlを細胞培養装置に無菌的に注入すると共に、上記懸濁液を培養床としての各細胞付着板に均等に分配させた。ガス注入口から、温度37℃、湿度100%、3%の二酸化炭素と97%空気とを混合した気体を通気し、培養液注入口から、上記培地を0.5ml/分の割合で灌流させることにより細胞培養を行なった。なお、灌流させる

培養液は、48時間毎に新しい培養液と交換した。

1週間培養を続けた後、細胞培養装置を分解し、トリプシン、EDTAを含むPBSを用いて各培養床を洗浄することにより細胞を採取し、細胞数を測定したところ、細胞付着板の単位面積当り、4.3×10<sup>5</sup>個/cm<sup>2</sup>に達していた。

##### 実験例2

酸素ガス20SCCMの雰囲気下、放電出力20Wでプラズマ処理された2枚のポリスチレン板、0.3重量%のコラーゲン溶液(新田ゼラチン精製、Cellmatrix Type I-P)を塗布した2枚のポリエチレン板および未処理のポリスチレン板を順次上方より配列して、第2図に示すような5段からなる培養床としての細胞付着板を有する細胞培養装置を作製した。次いで、上記実験例1と同様の条件でウサギ腎由来株化RK<sub>13</sub>細胞を4日間培養したところ、プラズマ処理した培養床では、3.1×10<sup>5</sup>個/cm<sup>2</sup>、コラーゲンを塗布した培養床では、4.1×10<sup>5</sup>個/cm<sup>2</sup>に細胞が増殖していることが判明した。これに対して、未処理のポリスチレ

ン板からなる培養床では、細胞密度は、 $2.6 \times 10^5$  個/ $\text{cm}^2$ にとどまった。

### 実験例 3

細胞付着板として波形構造を有する6枚のポリエチレン製板を非平行状態で配列し、第3図に示されるような6段の培養床を有する細胞培養装置を作製した。なお、上記培養床の細胞付着可能な面積は、合計450  $\text{cm}^2$ であった。

培養液として、E A R L E の塩類溶液150 mlに、L-アルギニン、L-グルタミン、L-ロイシン、L-リジンおよびL-バリンをそれぞれ濃度0.1 mg/mlとなるように加えると共に牛胎児血清を濃度10%となるように加えたものを用いた。また、細胞懸濁液として、上記培養液中で培養したマウス脾臓由来の細胞を $3 \times 10^7$ 個含有する細胞懸濁液を用いた。上記細胞培養装置を37℃に保たれた恒温槽内に設置し、細胞懸濁液を無菌的に注入し、各培養床に均等に分散させた。そして、上記実験例1と同様にして細胞培養を行なったところ、1週間の培養で、細胞総数は、 $2.6 \times 10^8$ 個

に増殖していることが判明した。

### < 発明の効果 >

以上のように、本発明の細胞培養装置によれば、支持棒で囲繞された細胞付着板が、培養液が所定方向に流れるように配列されているので、細胞付着板に接着した細胞に新鮮な培養液を常に供給することができ、細胞培養を長期に亘り行なうことができる。また、上記細胞付着板が複数段に配列されているので、装置当りの細胞の接着表面積を大きくすることができると共に、培養液の回収が極めて容易であり、細胞が産生する生理活性物質等の有用物質の回収、精製や、細胞が副生する老廃物の除去が簡単に行なえるという特有の効果を奏する。

### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の細胞培養装置の一実施例を示す概略図、

第2図および第3図は他の実施例を示す概略断面図である。

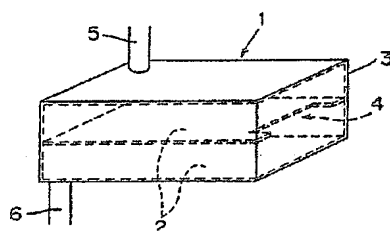
(1)(11)(21)…細胞培養装置、

(2)(12)(22)…細胞付着板、(3)(13)(23)…支持棒、  
(17)…凸部。

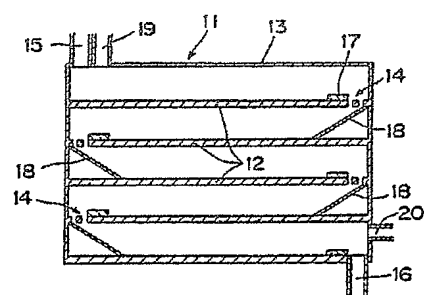
特許出願人 住友電気工業株式会社  
代理人 弁理士 龜 井 弘 勝  
(ほか3名)



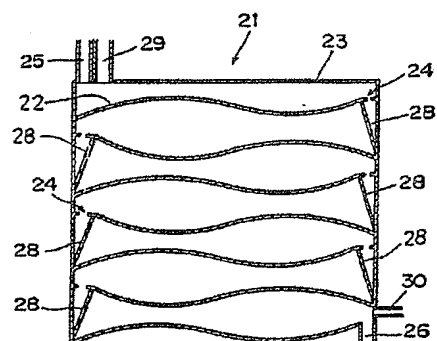
第 1 図



第 2 図



第 3 図



符号	名 称
(1)(11) (12)	細胞培養装置
(2)(12) (22)	細胞付着板
(3)(13) (23)	支 持 棒
(17)	凸 部